

### **3. Eigene Untersuchungen**

#### **3.1. Material und Methoden**

##### **3.1.1. Tiere:**

Insgesamt standen 41 Kühe (5-7 Jahre) und 12 Färsen (15-18 Monate) der Rasse Deutsche Schwarzbunte mit einem Körpergewicht von 530-570 kg (Kühe) bzw. 280-350 kg (Färsen) für die Untersuchungen zur Verfügung.

Die Tiere waren in Anbindehaltung aufgestallt.

Bei Untersuchungsbeginn wurden alle Tiere einer allgemeinen und gynäkologischen Untersuchung nach der von ROSENBERGER (1990) beschriebenen Methode unterzogen. Tiere, die in die Untersuchungen aufgenommen wurden, mußten ein ungestörtes Allgemeinbefinden haben und bei der gynäkologischen Untersuchung frei von pathologischen Befunden sein.

Die Futterration bestand aus Heu und Kraftfutter, zusätzlich konnte in der Zeit von April bis September Grünfutter angeboten werden.

##### **3.1.2. Zyklusinduktion**

Zur Induktion des Zyklus wurde Tieren, welche einen Blütegelbkörper (Cl) aufwiesen, intramuskulär  $\text{PGF}_2\alpha$  (25 mg Dinoprost, Glandin N<sup>®</sup>, Lohmann Animal Health) appliziert.

##### **3.1.3. Definitionen:**

**Dominanter Follikel (morphologisch):** Als dominierender Follikel einer Follikelwelle wurde derjenige Follikel bezeichnet, welcher eine Größe von über 9 mm erreichte und den Durchmesser der anderen Follikel überschritt.

**Untergeordnete Follikel:** Als untergeordnete Follikel wurden diejenigen definiert, welche zwar parallel mit dem DF ihr Wachstum begannen, jedoch nicht mehr als 9 mm Durchmesser erreichten.

**Follikelwelle:** Der Beginn einer Follikelwelle wurde durch den Tag festgelegt, an welchem der zugehörige DF erstmals beobachtet werden konnte.

**Tag der Divergenz:** Der Tag an dem eine Abweichung in der Wachstumsrate zwischen dem DF und dem größten untergeordneten Follikel festgestellt wurde, wurde als Tag der Divergenz bezeichnet.

**Wachstumsdauer:** Reicht vom Tag der ersten Beobachtung des Follikels bis zum Tag, an dem keine signifikante festzustellende Zunahme mehr erfolgte.

**Wachstumsrate (mm/Tag):** Entspricht dem Maximaldurchmesser des Follikels abzüglich des Durchmessers des Follikels am ersten Tag seiner Beobachtung während der Wachstumsdauer des Follikels.

**Plateauphase:** Der Zeitraum, in dem der Follikel keine signifikant festzustellende Zu- bzw. Abnahme zeigte.

**Atresiedauer:** Reicht vom Tag, an dem der Follikel gegenüber dem Vortag deutlich kleiner war, bis zu dem Tag, an dem er nicht mehr beobachtet werden konnte.

**Atresierate (mm/Tag):** Entspricht dem Maximaldurchmesser des Follikel abzüglich des Durchmessers des Follikels am letzten Tag seiner Beobachtung während der Atresiedauer des Follikels.

**Tag der Brunst:** Als Tag der Brunst wurde derjenige Tag angesehen, an welchem sowohl deutliche äußere (Unruhe, Vulvaödem, Brunstgesicht, Duldungsreflex, Brunstschleim) als auch innere Brunstsymptome (stark kontraktlicher Uterus, ein Follikel >11mm) vorhanden waren.

**Tag der Ovulation:** Als Tag der Ovulation wurde derjenige Tag definiert, an welchem der zur Ovulation erwartete Follikel erstmalig nicht mehr mittels Ultraschall dargestellt werden konnte.

### 3.1.4. Plan der Untersuchungen

Die Untersuchungen wurden in drei Abschnitten durchgeführt (Tab. 7).

Tab. 7: Untersuchungsabschnitte und Anzahl der Tiere

Untersuchungsabschnitt	Tiere
Untersuchungsabschnitt I: Zur morphologischen Charakterisierung der Follikeldynamik bzw. des DF der ersten Follikelwelle (Ultraschallgestützte Untersuchungen)	41 Kühe 12 Färsen
Untersuchungsabschnitt II: Zur funktionellen Charakterisierung des DF <ol style="list-style-type: none"><li>1. Hormongehalt des DF am 10. Zyklustag</li><li>2. Reaktion des DF am 10. Zyklustag auf eine <math>PGF_2\alpha</math>-Applikation</li><li>3. Beobachtung der Follikeldynamik nach Entfernung des DF und <math>PGF_2\alpha</math>-Applikation am 10. Zyklustag</li></ol>	17 Kühe + 8 Färsen 14 Kühe 7 Kühe
Untersuchungsabschnitt III: Zum Einfluß des dominanten Follikels auf die Follikelpopulation bzw. -reifung nach PMSG/ $PGF_2\alpha$ -Stimulationsregime	12 Färsen

### 3.1.5. Durchführung der Untersuchungen

3.1.5.1. Untersuchungsabschnitt I: Zur morphologischen Charakterisierung der Follikeldynamik bzw. des dominanten Follikels der ersten Follikelwelle bei Kühen und Färsen

Mit dem Hauptziel den DF am 10. Zyklustag morphologisch zu charakterisieren wurden 41 Kühe und 12 Färsen in diesen Untersuchungsabschnitt aufgenommen.

- Eine ultraschallgestützte Ovaruntersuchung erfolgte, beginnend am Tag der Brunst (Brunst = Tag 0), einmal täglich bis zum 10. Zyklustag.
- Die Ultraschalluntersuchung wurde mittels einer 5 MHz-Linear Sonde (Aloka, Echokamera SSD-210 DX II, Schallkopf 5.0 MHz) durchgeführt. Die Dokumentation der

ermittelten Ultraschallbefunde erfolgte unter Zuhilfenahme eines VHS Videorecorders (VO-6800PS, SONY).

- Der größte Durchmesser der dargestellten Follikel wurde im laufenden Videofilm identifiziert und daraufhin mittels einer selbst hergestellten, skalierten Schablone am stehenden Bild unmittelbar am Bildschirm abgelesen.
- Die relative Lage der Funktionskörper zueinander wurde ebenfalls mittels einer Videoaufzeichnung am laufenden Bild sowie anhand mehrerer repräsentativer Querschnitte am stehenden Bild bestimmt.
- Abschließend wurden alle ermittelten Ergebnisse der Ultraschalluntersuchung in Form einer Skizze festgehalten.
- Anhand der ermittelten Follikeldurchmesser wurde die gesamte Follikelpopulation jedes Tieres in drei Gruppen ( $<5$  mm, 5-9 mm,  $>9$  mm) eingeteilt.
- Parallel hierzu wurde der Tag ermittelt, an welchem das sich anbildende Corpus luteum (Cl) erstmals eindeutig dargestellt werden konnte. An diesem Funktionskörper wurde der Durchmesser durch den Mittelwert seiner maximalen Höhe und Breite bestimmt.
- Der Unterschied zwischen Kühen und Färsen hinsichtlich der Follikelpopulation, der Entwicklung des DF, des Cl sowie des größten untergeordneten Follikels (guF) wurden ab dem Tag 0 bis zum Tag 10 besonders berücksichtigt.
- Zusätzlich wurden die inter- und intraovarielle Beziehung zwischen dem DF, dem Cl sowie den untergeordneten Follikeln hinsichtlich der Lage sowie des numerischen Verhaltens zueinander festgehalten.

### **3.1.5.2. Untersuchungsabschnitt II: Zur funktionellen Charakterisierung des dominanten Follikels am 10. Zyklustag**

#### **3.1.5.2.1. Aspiration und Hormonanalyse der Flüssigkeit des dominanten Follikels am 10. Zyklustag**

Es wurde zum Ende des Beobachtungszeitraumes des Untersuchungsabschnitt I, also am 10. Zyklustag, eine manuell geleitete transvaginale Punktion des im vorausgegangenen Untersuchungsabschnitt dargestellten DF bei 17 Kühen und 8 Färsen vorgenommen. Die Punktionstechnik wurde im Vorfeld der Untersuchungen etabliert und evaluiert (ALI et al., 1998).

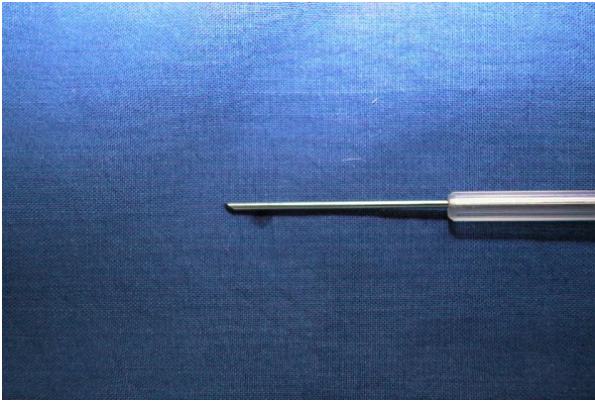
Zur Vorgehensweise bei der manuell geleiteten transvaginalen Follikelpunktion (Abb. 1):

1. Ort der Manipulation: Standplatz des Tieres im Stall, Fixierung des Tieres lediglich mittels Freßfanggitter.
2. Epidurale Applikation von Hostacain<sup>®</sup> (Butanilicain, 5ml/Tier, Hoechst, Frankfurt).
3. Entleerung des Enddarms, Ausbinden des Schwanzes nach dorso-kranial.
4. Transrektale palpatorische und ultraschallgestützte Ermittlung des Ovarbefundes.
5. Gründliche Reinigung (trocken) des Perinealbereiches sowie der Vulva.
6. Einführen einer Punktionskanüle (1,2 × 500mm, Anschliffwinkel 45°, Firma Arno Schnorrenberg, Berlin) im Schutze eines Besamungskatheters in das Vestibulum und anschließend Vorschieben bis in die Fornix Vaginae unter transrektaler Kontrolle.
7. Durchführung der Punktion selbst:
  - Der Operateur fixiert von transrektal manuell das den DF tragende Ovar.
  - Vorsichtiges Andrücken des Ovars gegen die Öffnung des intravaginal positionierten Besamungskatheters. Dabei sollte die Katheteröffnung, welche als Führung für die Punktionskanüle dient, in der Nähe des palpierbaren Anteils des Follikels auf das Ovargewebe treffen.
  - Einführen der Punktionskanüle mittels einer kurzen Vorwärtsbewegung unter den Cortex des Ovars.
  - Subcorticales Vorschieben der Punktionskanüle in Richtung des DF.
  - Vorsichtiges Einführen der Kanülenspitze in das Follikellumen unter digitaler Kontrolle.
  - Vorsichtiges Aspirieren des Follikelinhaltes mittels einer aufgesetzten 5 ml Spritze, in welcher vorab 1ml Luft vorgelegt war.
  - Digitale Kontrolle des Aspirationserfolges durch Feststellung einer Konsistenzänderung des Follikels.
  - Vorsichtiges Zurückführen und Entnahme der Punktionsvorrichtung.
  - Ultraschallkontrolle des punktierten DF unmittelbar im Anschluß an die Manipulation (Abb. 2).
  - Bei Färsen wurde nur eine Probe (50 µl) von der Flüssigkeit des DF unter seiner Erhaltung entnommen (s. u.).
8. Vorbereitung des Punktates für die Aufarbeitung im Labor:
  - Überführen der Punktionsflüssigkeit in 2 ml Eppendorfgefäße.
  - Verdünnung (V/V) mit NaCl (0,9%) und Heparin (2,2 I.E./ml) im Verhältniss 1:10, 1:100, 1:1000.

- Lagerung der Probe bei -20°C.

#### 9. Hormonbestimmung der Follikelflüssigkeit des DF:

Nach der von GLATZEL und SCHALLENBERGER (1990) beschriebenen Methode wurde die Follikelflüssigkeit mittels eines RIA (Radio Immuno Assay) auf ihren P<sub>4</sub> und E<sub>2</sub> Gehalt untersucht. Hierbei kam mit I<sup>125</sup> markiertes P<sub>4</sub> und E<sub>2</sub> der Firma Amersham Buchler zum Einsatz. Dabei betrug der intra- bzw. der inter Assay-Variationskoeffizient 13,5% bzw. 15% für P<sub>4</sub> und 8,5% bzw. 13,5% für E<sub>2</sub>. Die Kreuzreaktionen der verwendeten Antikörper gegen hier konkurrierenden Steroidhormone waren für den Antikörper gegen P<sub>4</sub> nie mehr als 3,3% (Testosteron) und gegen den für die E<sub>2</sub> - Bestimmung genutzten Antikörper nie größer als 2,1% (Österon).



a: Die Punktionskanüle im Schutz eines Besamungskatheters



b: Andrücken des Ovars gegen die Öffnung des intravaginal positionierten Besamungskatheters



c: Einführen der Punktionskanüle intravaginal, dann ins Ovargewebe am Rand des DF



d: Subcorticales Vorschieben der Kanüle in den DF. Aspirieren des Follikelinhaltes unter digitaler Kontrolle

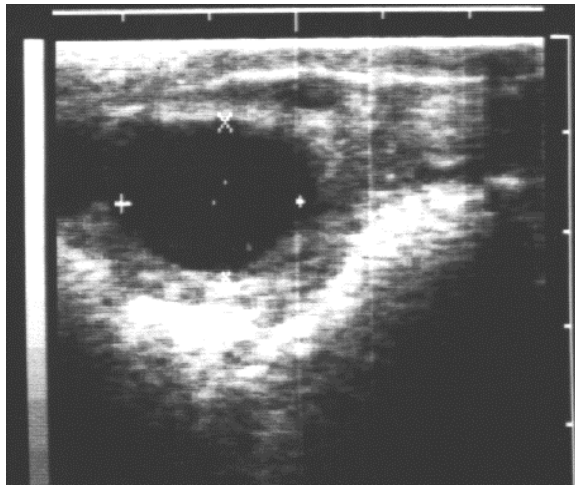


e: Zurückführen und Entnahme der Kanüle

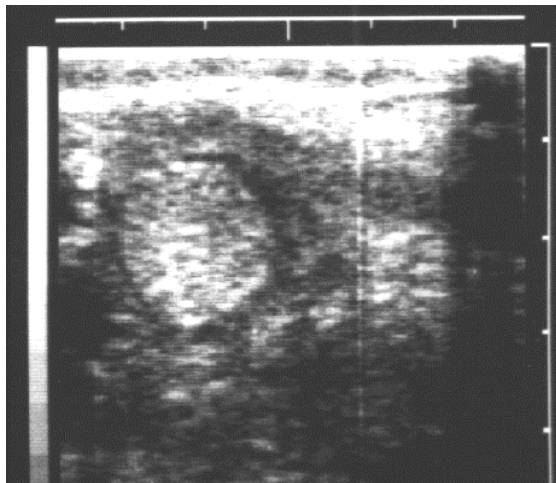


f: Aspirierter Follikelinhalt in einer Spritze

Abb.1: Die manuell geleitete transvaginale Follikelpunktion



a: DF vor der Punktion



b: DF nach der Punktion

Abb. 2: Sonographische Darstellung des dominanten Follikels (DF) vor und nach der Punktion